

実験的誘発舌癌における浸潤増殖像の検討

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

川 尻 秀 一

口腔扁平上皮癌発生後の浸潤増殖像ならびに腫瘍の増大過程に伴うその変化の様相を明らかにする目的で、ジメチルベンズアントラセン (9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene, DMBA) 誘発ハムスター舌癌の浸潤様式を検討した。ハムスターの右舌側縁部を歯科用クレンザーで擦過した後、1.0% DMBA アセトン溶液を週3回塗布した。第1実験では、発癌処置をハムスターが悪液質になるまで続け、その後屠殺し組織学的検討を行った。その結果、実験開始後12週目以降には大部分のハムスターの右舌側縁部に癌様の腫瘍を認めた。肉眼的には腫瘍は外向性発育型と内向性発育型の2つのタイプに分類され、肉眼的発育形態と浸潤様式との間には統計学的に関連性が認められた ($P < 0.05$)。すなわち、内向性の腫瘍は外向性の腫瘍に比べてより浸潤性が強いことが示された。第2実験では、12週目まで上記と同様の発癌処置を続けた後に、ハムスターを無作為に3つの群に分けた。すなわち、屠殺まで同じ発癌処置を行ったA群と、12週目以後はDMBAの塗布のみを行ったB群、以後は放置したC群の3つに分けた。その後、13週目から17週目までに順次屠殺し組織学的に検討を行った。その結果、A群の腫瘍はB群やC群に比べやや浸潤性が強くなる傾向にあった。また、発癌後の標本採取時期と浸潤様式との間には密接な関連性がみられた ($P < 0.05$)。すなわち、初期の癌では一般的に腫瘍と宿主の境界は比較的明瞭であったが、癌の進展に伴って境界が不明瞭でび慢性に浸潤する腫瘍が増加した。一方、基底膜が広範囲に消失している腫瘍ではよりび慢性の浸潤像を示す傾向があり、基底膜の消失程度と浸潤様式との間には密接な関連性がみられた ($P < 0.01$)。また、浸潤様式が1型から4C型になるに伴って、癌細胞の増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 陽性細胞率が徐々に増加した。特に浸潤様式4C型のPCNA陽性細胞率は他の浸潤様式のものより有意に高かった ($P < 0.05$)。

Key words tongue carcinoma induced by DMBA, mode of invasion, progression of cancer, basement membrane, proliferating cell nuclear antigen

口腔癌の治療成績は新しい治療法の開発や診断技術の進歩により年々向上しつつある¹⁾。最近ではさらに治療前の臨床および病理組織学的所見からの癌の悪性度を判定し、個々の癌の悪性度に応じた治療法を選択することによって根治性と機能保存の両面を満足させることも可能となってきた²⁾。特に口腔扁平上皮癌では、このような悪性度と関連する所見の中で癌の深部への浸潤像が転移や予後と密接な関係があるとする報告が多数みられ^{3)~6)}、その浸潤様式⁷⁾が重要な予後因子の一つとして注目されている。しかし、症例による浸潤像の違いがなぜ生じるのか、浸潤像は癌の増大や進展に伴って変化するのかなど、未だ不明な点が多い。そこで当講座では、これらの点を解明する目的で1989年以来、口腔扁平上皮癌の浸潤様式に関する実験的研究を系統的に開始している。そのうちヒト口腔癌由来の株化細胞の浸潤像の再現性に関する研究では、児島ら⁸⁾¹⁰⁾がコラーゲンゲル培地を用いて浸潤モデルを作製し、その浸潤性を再現している。同じく著者ら¹¹⁾¹²⁾のヌードマウスの舌、口底部へのヒト口腔癌株化細胞移植法においても、臨床での浸潤像と極めて類似の浸潤像の再現に成功している。

一方、実験的に口腔癌を形成してその性状を解明しようとする試みは1927年に Bonne¹³⁾がマウスの口腔粘膜にコールタール

を塗布して扁平上皮癌を発生させたのが最初とされ、その後各種の動物や発癌物質を用いて多くの実験がなされている^{14)~17)}。その中でも、ハムスターの舌縁部を歯科用クレンザーで擦過後、9, 10-ジメチル-1, 2-ベンズアントラセン (9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene, DMBA) を塗布する藤田ら¹⁷⁾の方法は、短期間で高率に舌癌を形成することができるため、口腔扁平上皮癌の基礎的研究^{18)~23)}に広く用いられるようになり、最近では、発癌過程の免疫組織化学的検討¹⁹⁾²⁰⁾や、各種薬剤による抗腫瘍効果²¹⁾²²⁾に関する研究などにも応用されている。そこで本研究では口腔扁平上皮癌発癌後の浸潤増殖動態を明らかにする目的で、藤田ら¹⁷⁾の方法による実験的誘発舌癌モデルを用い、浸潤様式分類からみた各種浸潤形態の頻度、これら浸潤像と腫瘍の肉眼的発育形態との関係、および発癌後の刺激の違いや腫瘍の増大・進展過程に伴う浸潤像の変化、さらに浸潤様式分類からみた癌細胞周囲基底膜の性状ならびに癌細胞の増殖動態との関係について検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験には6週齢・雄・体重約80gのシリアン系ゴールデン

平成5年9月7日受付, 平成5年9月29日受理

Abbreviations: AEC, 3-amino-9-ethyl carbazole; DAB, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DMBA, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; HE, hematoxylin and eosin; LSAB, labelled streptavidin biotin; 4NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide; PAM, periodic acid methenamine-silver;

ハムスター(栗津実験動物, 摂津)を75匹使用した。飼料は実験動物用固型飼料 MF (オリエンタル酵母, 東京)を、飲料水は水道水をそれぞれ自由摂取させた。

II. 実験方法

実験は2回に分けて行った。第1実験では30匹のハムスターを用い、発癌の初期から悪液質となり腫瘍死する直前まで腫瘍を肉眼的に観察するとともに、腫瘍死直前の時期の組織像を観察した。第2実験では45匹のハムスターを用い、発癌初期から進行癌となるまでの組織像の変化と、発癌後に加えた刺激の違いによる浸潤像の変化について検討した。以下にそれぞれの実験方法を示す。

1. 第1実験

発癌剤として1.0% DMBA (和光純薬工業, 大阪) アセントン溶液を使用し、発癌操作は藤田らの方法¹⁷⁾に従った。すなわち、エーテル麻酔下に週3回、ハムスターの右側舌縁部を歯科用クレンザーで数回擦過した後、発癌剤の塗布を行った。この間、右側舌縁部を肉眼的に観察するとともに体重測定を行い、腫瘍の増大に伴い悪液質となり、体重が著しく減少し、最大体重時の3割減となった時点で屠殺し標本を採取した。

2. 第2実験

第1実験の結果から、ほとんどのハムスターに腫瘍形成が認められたのが12週であったことから、12週までは第1実験と同様の発癌操作を45匹のハムスターに行った後、第2実験を行った。すなわち、その後15匹ずつ3つのグループに分けて、さらに同様の発癌操作を続けたA群、13週目以降はDMBAの塗布のみを行ったB群、13週目以降は何もせず放置したC群に分け、13週より17週まで各群毎週3匹ずつ屠殺し標本を採取した。

III. 組織標本の作製法

屠殺後直ちに解剖し、舌に形成した腫瘍を周囲組織を含めて一塊として切除した。また、転移を検索する目的で頸部リンパ節と肺を切除した。切除した組織片はすべてペリオデイトーリジン-パラホルムアルデヒド(periodate lysine paraformaldehyde, PLP)固定液で4℃、24時間固定を行った。顎骨を含み切除したものは、固定後、18%エチレンジアミン四酢酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) (和光純薬工業)脱灰液にて72時間脱灰した。以後は通法に従いパラフィン包埋し、3μmのパラフィン切片を作製した後、以下の染色を行った。すなわち、第1実験と第2実験から得られたすべての標本についてはヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin, HE)染色と増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)に対する免疫組織染色を行い、さらに第2実験から得られた標本については、過ヨウ素酸メセナミン銀(periodic acid methenamine-silver, PAM)染色、過ヨウ素酸シッフ(peridic acid Schiff, PAS)染色およびN型コラーゲンとラミニンに対する免疫組織染色を加えて行った。

IV. 免疫組織染色

パラフィン切片をキシレン-エタノール系列にて脱パラフィンした後、0.3%過酸化水素水(三菱瓦斯化学, 東京)による内因性ペルオキシダーゼのブロックを行い、正常ヤギ血清(ダコジャパン, 京都)による非特異的反応のブロック後、一次抗体

を室温中で90分間反応させた。なお、N型コラーゲンとラミニンに対しては、脱パラフィン後0.1%トリプシン(Sigma, St. Louis, U.S.A)で37℃10分間の前処理を行った。使用した一次抗体はマウス抗ヒトPCNAモノクローナル抗体(ダコ・ジャパン)、ウサギ抗ウシN型コラーゲンモノクローナル抗体(LSL, 東京)、ウサギ抗マウスラミニンモノクローナル抗体(LSL)であり、各々25倍、250倍、2000倍に希釈して用いた。次いで、PCNA抗体に対してはビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体と室温中で15分間、N型コラーゲンとラミニンに対してはビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体と室温15分間反応させ、ラベルドストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ダコジャパン)と10分間反応後、N型コラーゲンは3%アミノエチルカルバゾール(3-amino-9-ethyl carbazole, AEC) (ダコジャパン)で、ラミニンおよびPCNAは0.1%ジアミノベンチジントトラクロライド(3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) (和光純薬工業)で発色させた。核染色にはヘマトキシリンを使用した。また、陰性対照として一次抗体を含まないリン酸緩衝液(phosphate buffered saline, PBS)を使用し、上記と同様の方法で反応を行った。

V. 組織学的検討項目

各染色標本を光顕的に観察し、以下の項目について検討した。

1. 癌浸潤様式

形成された腫瘍の浸潤様式を山本・小浜分類⁸⁾に準じて分類した。すなわち、癌浸潤先進部の組織像を光顕的に観察し、腫瘍と間質の境界線が明瞭なものを1型、境界線にやや乱れがあるものを2型、境界線が不明瞭で大小の腫瘍胞巣が散在性に認められるものを3型、小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤するものを4C型、腫瘍胞巣をつくらずに慢性に浸潤するものを4D型とした。

2. 基底膜の性状

第2実験での発癌例を用いて浸潤先進部の腫瘍胞巣周囲の基底膜の性状を、基底膜を特異的に染色するPAM染色、PAS染色、およびN型コラーゲンとラミニンの免疫組織染色の標本より観察した。基底膜の性状は癌胞巣周囲の基底膜の連続性の程度によって、基底膜の連続性が保たれているもの(連続群)、基底膜の一部が消失して不連続となっているもの(不連続群)、基底膜が広範囲にわたって消失しているもの(広範囲消失群)の3群に分類した。

3. PCNA 陽性細胞率

第1および第2実験での発癌例を用いて抗PCNA抗体による免疫組織染色の標本から陽性細胞の比率を算定した。すなわち、各標本の浸潤先進部を無作為にそれぞれ2カ所ずつ選び、腫瘍細胞1000個に対するPCNA陽性細胞の比率を算定し、その平均を各腫瘍のPCNA陽性細胞率とした。なお、陽性対照としてヒト正常リンパ節の胚中心を用い、それより染色濃度の淡いものは除外して、対照と同程度以上の染色濃度を示した細胞を陽性とした。

VI. 統計学的解析法

各群間の有意差検定は、二群間の検定においてWilcoxon検定を、多群間の検定においてKruskal-Wallis検定を行った。ま

PAS; periodic acid Schiff; PBS, phosphate buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PLP, periodate lysine paraformaldehyde

た、それらは5%未満の危険率をもって有意とした。

成 績

1. 第1実験

1. 肉眼的所見

ハムスターの舌は実験開始後3週目までは特に異常所見を認めなかったが、4週目頃から右側舌縁部に肥厚が認められ、やや白色の色調をおびるようになってきた。9週目になると同部に直径約1mmの乳頭様小腫瘤を形成するものもみられるよう

になり、12週目にはほとんどのハムスターの舌に腫瘍が認められた。その後も腫瘍は徐々に増大し、15週目以降には体重が著明に減少し、悪液質の様相を呈するものも認められるようになった。そこで、体重減少の著しいものから順次屠殺し、早いものでは、15週目に、最も遅いものでも24週目には屠殺した。屠殺時期の平均は18.6週であった。なお、実験を行ったハムスター30匹中2匹が事故死した。この2匹を除く28匹の腫瘍の発育形態は外向性が21匹(75.0%)、内向性が7匹(25.0%)であった(図1)。



Fig. 1. Macroscopic appearances of the induced tongue carcinomas. Classified by the macroscopic appearance of the cancers, 21 tumors (75.0%) were of exophytic type and 7 (25.0%) of endophytic type. [a], Exophytic type; [b], Endophytic type.

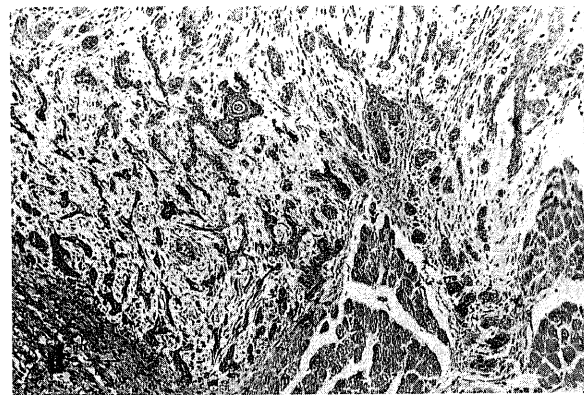
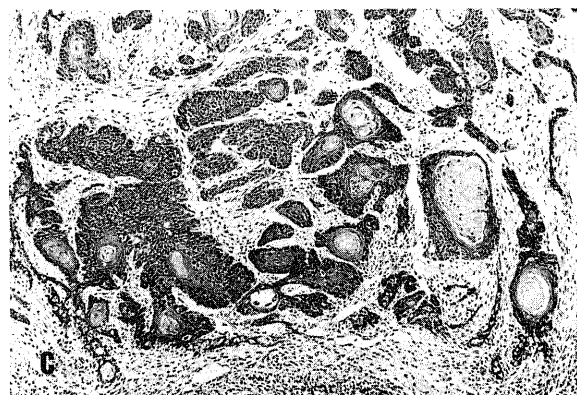
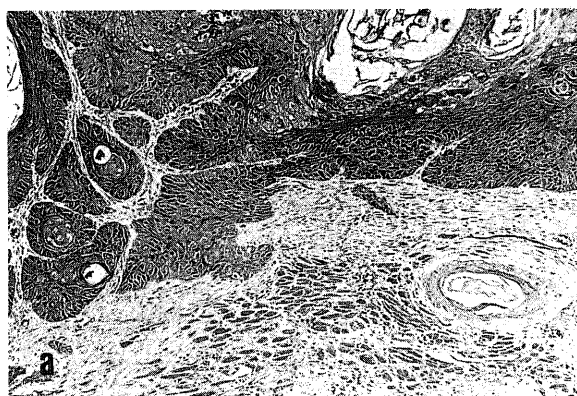


Fig. 2. Photomicrographs of hamster's tongue carcinomas showing the mode of cancer invasion. [a], grade 1 (well defined borderline type, HE stain, $\times 75$); [b], grade 2 (less marked borderline type, HE stain, $\times 75$); [c], grade 3 (groups of cells and no distinct borderline type, HE stain, $\times 75$); [d], grade 4C (diffuse invasion of cord-like type, HE stain, $\times 75$).

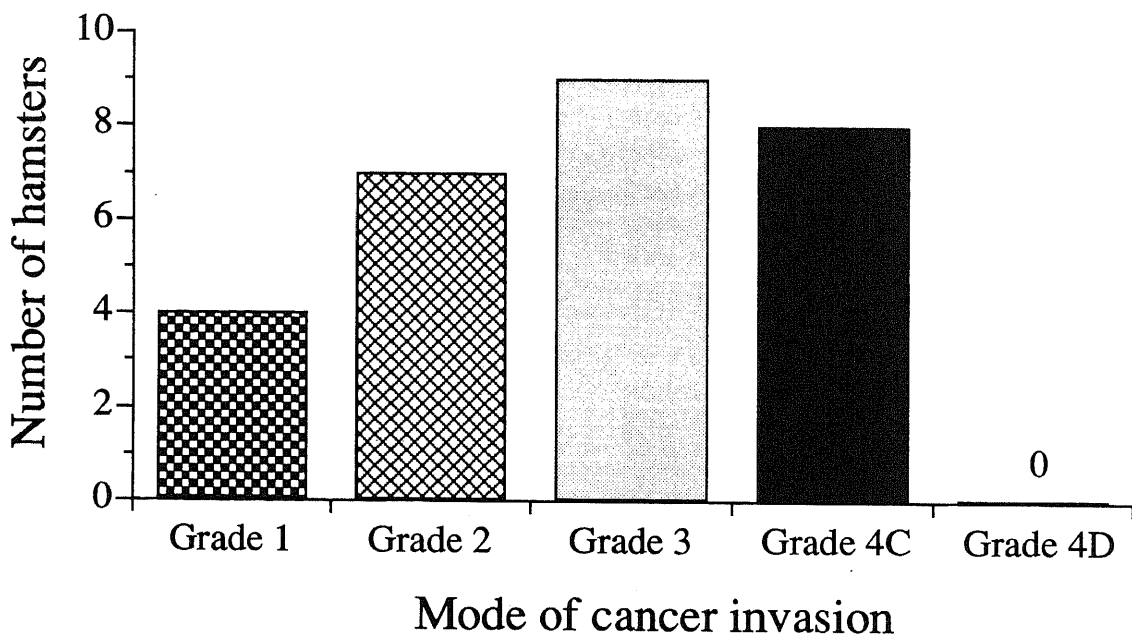


Fig. 3. Mode of cancer invasion on the cachectic hamsters. 28 cases of induced carcinoma on the first experiment were classified by mode of invasion: 4 cases (14.3%) grade 1, 7 cases (25.0%) grade 2, 9 cases (32.1%) grade 3, 8 cases (28.6%) grade 4C, and grade 4D was not seen.

2. 組織学的所見

事故死した2匹を除く28匹すべてに組織学的に発癌を認め、発癌率は100%であった。組織型はすべて扁平上皮癌であり、分化度はほとんどが高分化型であったが、部分的に中等度分化の部分も認められた。これらを浸潤様式別に分けると、1型4匹(14.3%)、2型7匹(25.0%)、3型9匹(32.1%)、4C型8匹(28.6%)であり、4D型の腫瘍は認められなかった(図2, 3)。これら28匹のうち3匹(10.7%)に頸部リンパ節への転移(図4)を認めたが、他臓器への転移は認められなかった。リンパ節転移を認めた3匹の原発巣における浸潤様式は3型が1匹、4C型が2匹であった。

3. 肉眼的発育形態と浸潤様式との関係

腫瘍の発育形態と浸潤様式との関係をみると、外向性腫瘍は1型19.0%、2型28.6%、3型33.3%、4C型19.0%と各浸潤様式に分散する傾向にあったが、内向性腫瘍では1型0%、2型14.3%、3型28.6%、4C型57.1%で、4C型が半数以上を占めていた。すなわち、内向性に発育する腫瘍は外向性の腫瘍に比較してび慢性に浸潤する傾向を有し、両者の間には有意差が認められた($P<0.05$)。

II. 第2実験

1. 発癌率ならびに浸潤様式別頻度

実験で使用した45匹のハムスターのうち、上皮細胞に軽度の異型性を認めるが、組織学的には発癌前段階と思われる4匹を除き、発癌を認めたのは41匹で、発癌率は91.1%であった。組織型はすべて扁平上皮癌であり、分化度は高分化型であった。これらを浸潤様式別に分類すると、1型12匹(29.3%)、2型6匹(14.6%)、3型18匹(43.9%)、4C型5匹(12.2%)であり、第2実験においても4D型の腫瘍は認められなかった(図5)。これら41匹のうち2匹(4.9%)に頸部リンパ節への転移を認めたが、その他の臓器への転移は認められなかった。リンパ節転移を認めた2匹の原発巣の浸潤様式はいずれも4C型であった。

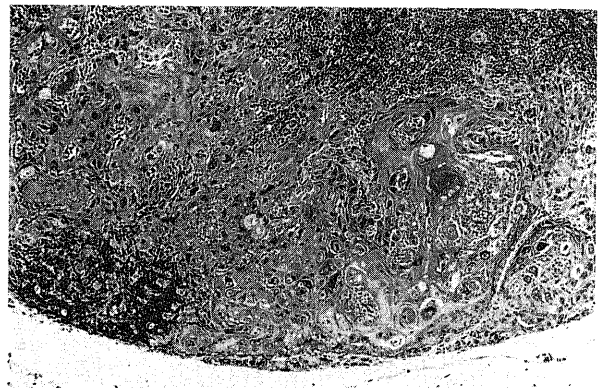


Fig. 4. Photomicrograph of regional neck lymph node metastasis. Metastasis to the regional neck lymph nodes was detected by histological examination in 3 cases (10.7%). Photomicrograph shows replacement of lymph node by metastatic carcinoma (HE stain, $\times 75$).

2. 発癌後の刺激の違いと浸潤様式との関係

発癌後の刺激の違いと浸潤様式との関係をみると、13週目以降はDMBAの塗布のみを続けたB群と何も行わず放置したC群では1, 2型に留まっていたものが多かったのに対し、13週目以降も歯科用クレンザーによる擦過とDMBAの塗布を続けたA群では浸潤様式3型が多い傾向であった(図6)。統計学的には、A群とB+C群との間には浸潤傾向において有意差を認めた($P<0.05$)が、各群間においては有意差は認めなかった。このように各群間の浸潤性に大きな差がなかったことは、腫瘍が形成された13週以後の刺激の差よりも12週までに形成された各々の腫瘍の自律的性格が強く反映する結果であった。

3. 標本採取時期と浸潤様式との関係

そこで、標本採取時期と浸潤様式との関係をみると、13, 14

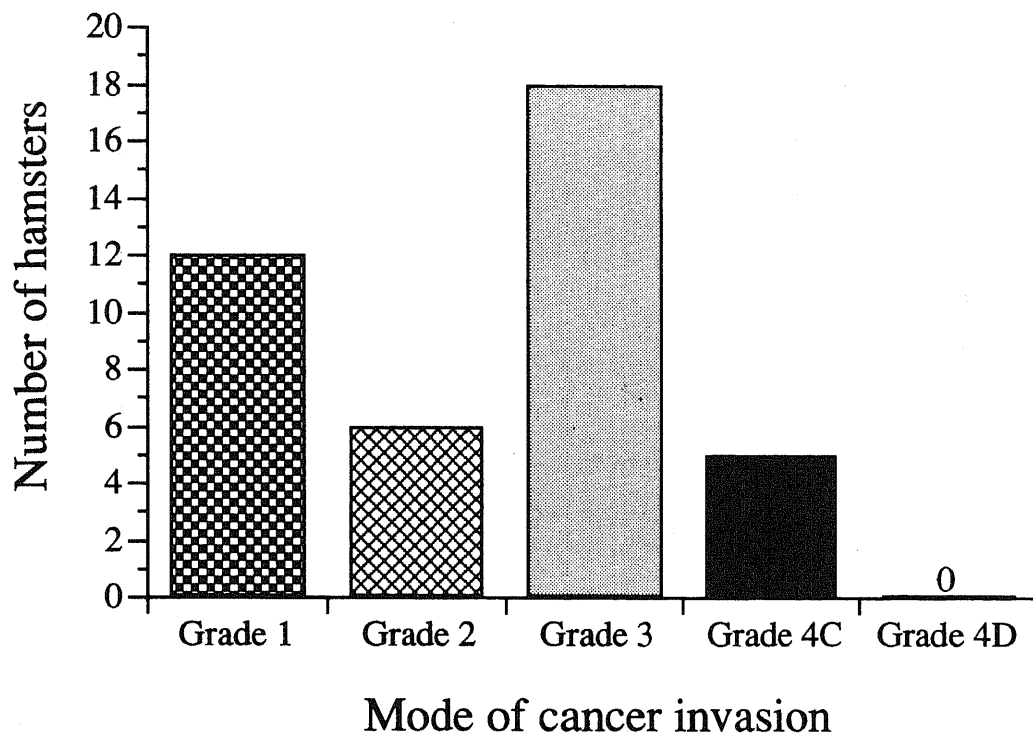


Fig. 5. Mode of cancer invasion on the second experiment. 41 cases of induced carcinoma on the second experiment were classified by grade of mode of invasion : 12 cases (29.3%) grade 1, 6 cases (14.6%) grade 2, 18 cases (43.9%) grade 3, 5 cases (12.2%) grade 4C, and grade 4D was not seen.

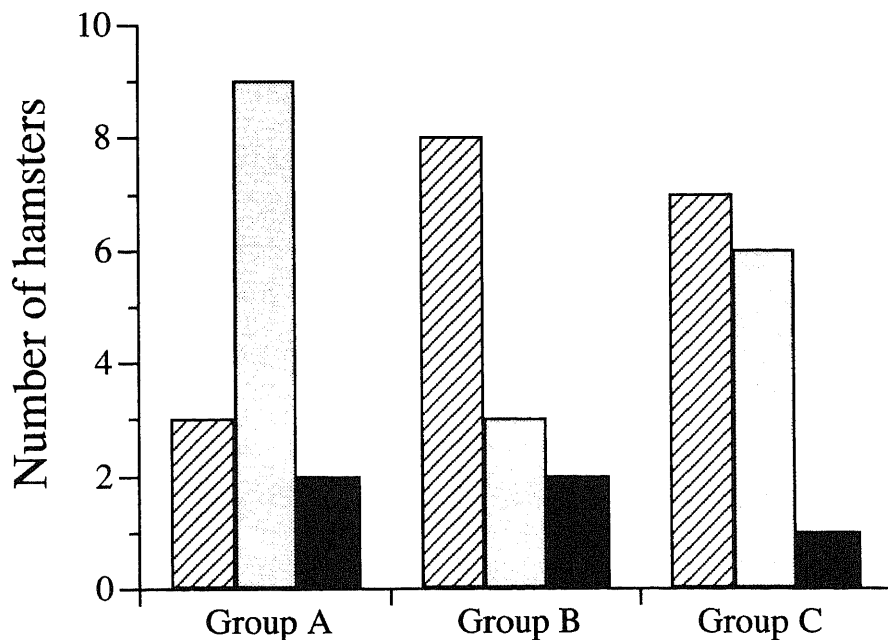


Fig. 6. Relationship between the difference of stimulation after the development of tumor and mode of cancer invasion. The hamsters were randomly divided into three groups: group A received the above procedures until killing, group B received only the application of DMBA and group C remained untreated after the 12 th week. Tumors were more invasive in group A than in groups B and C. But the difference between three groups was not statistically significant. Mode of cancer invasion: ▨ grade 1+2; ▤ grade 3; ■ grade 4C.

週目の発癌初期には1型, 2型が多く, 次第に3型が増える傾向にあり, 4C型は15週目以降のものにみられた(図7)。すなわち, 標本採取時期が遅くなるにつれて腫瘍は自律的に浸潤増殖し, より浸潤性の強いものが増加する傾向にあった ($P < 0.05$)。

4. 癌浸潤先進部における基底膜の所見

V型コラーゲンとラミニンは, いずれも正常粘膜上皮基底膜や脈管周囲基底膜では連続線状に認められたのに対して, 癌細胞巣と間質との境界部の基底膜領域では, 染色性が低下し, 断

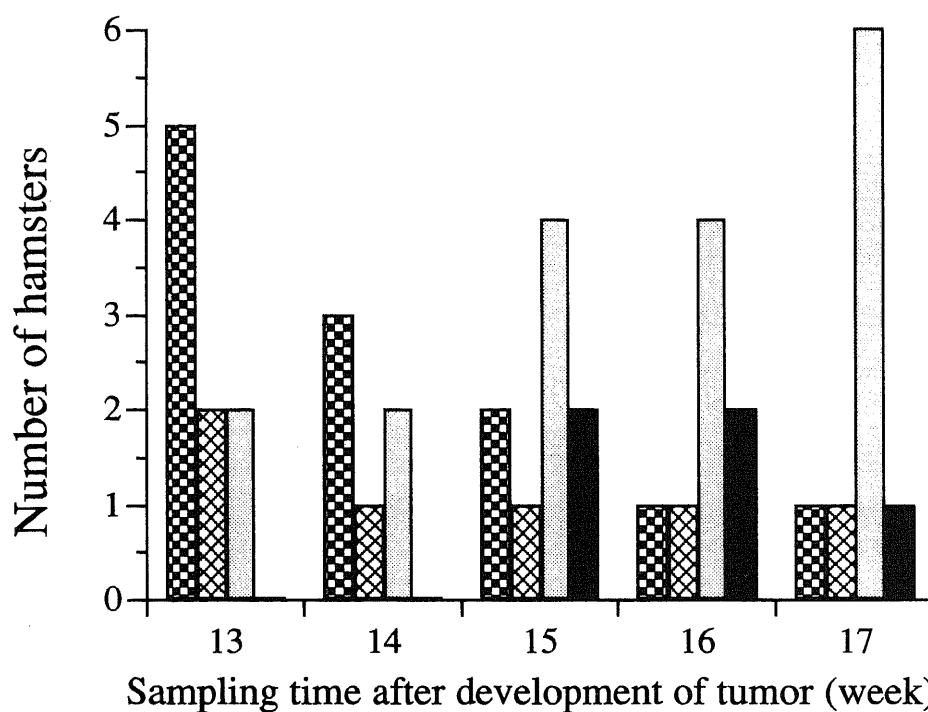


Fig. 7. Relationship between the sampling time after the development of tumor and mode of cancer invasion. Early cancer generally showed well or moderately defined tumor-host boundaries, while tumors with no distinct borderline or diffuse invasion increased with progression of cancer. There was a significant correlation ($p < 0.05$) between the sampling time after the development of tumor and mode of cancer invasion. Mode of cancer invasion: grade 1; grade 2; grade 3; grade 4C.

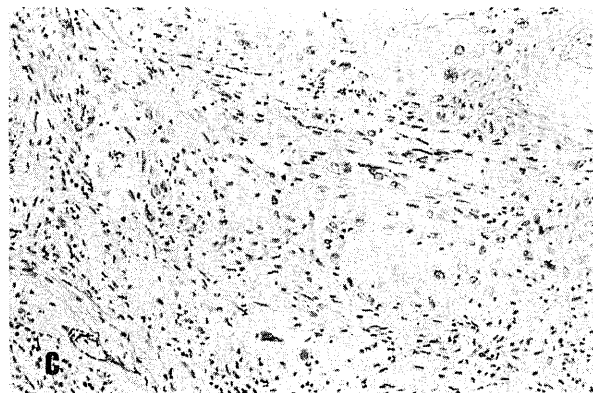
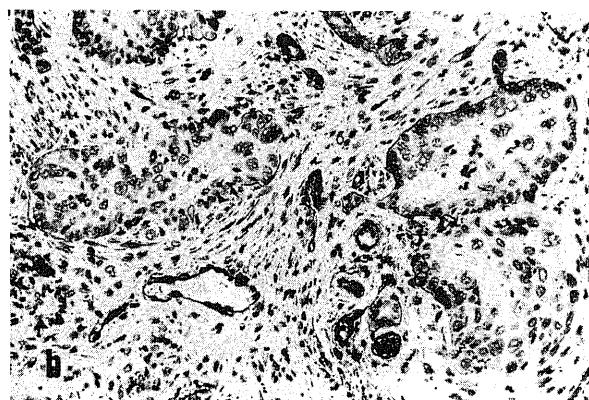
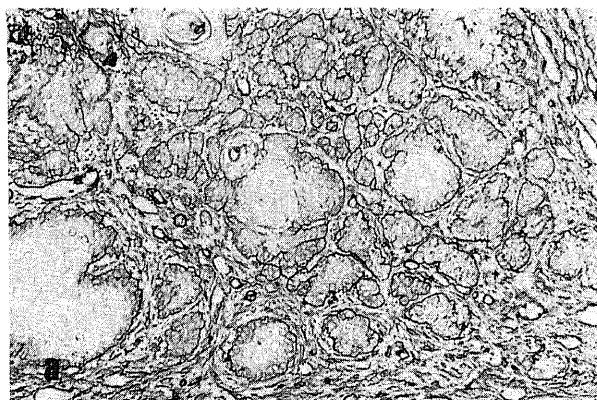


Fig. 8. Immunohistochemical staining for type IV collagen and laminin showing the distribution of basement membrane. [a], continuous type (the cancer cell nests are definitely surrounded by a band of basement membrane, laminin, $\times 120$); [b], discontinuous type (the basement membrane around cancer cell nests is characterized by fragmentation in some areas, type IV collagen, $\times 150$); [c], wide spread loss type (the basement membrane is virtually absent at the tumor-stromal interface, laminin, $\times 120$).

裂や消失しているものも多く認められた (図 8)。また、これらの所見は PAM 染色や PAS 染色での基底膜の所見とよく一致していた。

そこで発癌を認めた41匹を、癌浸潤先進部における癌巣周囲の基底膜の連続性の程度によって、連続群、不連続群および広範囲消失群の3群に分類した。その結果、連続群16匹 (39.0%)、不連続群15匹 (36.6%)、広範囲消失群10匹 (24.4%)であり、全体の約6割の腫瘍に基底膜の不連続や消失が認められた。

5. 標本採取時期と基底膜の連続性との関係

腫瘍の増大進展に伴う基底膜の変化を調べる目的で、発癌初期の13週目から腫瘍が増大した17週目までの基底膜の連続性の程度について検討した。その結果、13, 14週目では連続群が15匹中8匹 (53.3%) で半数以上を占めていたのに対して、15週目以降には不連続群と広範囲消失群が増加し、16, 17週目では、不連続群と広範囲消失群の占める比率が17匹中13匹 (76.5%) と高くなっていた (表 1)。統計学的には13, 14週目と16, 17週目

の基底膜の連続性の程度に有意差を認めた ($P < 0.05$)。

6. 浸潤様式と基底膜の連続性との関係

癌巣周囲の基底膜は浸潤様式が1型から4C型になるにつれて、不連続群や広範囲消失群が増加する傾向にあった。特に浸潤様式1型、2型18例においては連続群13例、不連続群5例であり広範囲消失群が認められなかったのに対して、4C型5例では連続群が認められず、不連続群2例、広範囲消失群3例であった (表 2)。統計学的には浸潤様式と基底膜の連続性との間に相関がみられ、浸潤様式が高度になるほど基底膜の連続性は失われる傾向にあった ($P < 0.01$)。また、頸部リンパ節転移を認めた2匹はいずれも広範囲消失群であった。

Ⅲ. PCNA 陽性細胞率

1. PCNA 陽性細胞の局在

PCNA 陽性細胞は、正常舌粘膜上皮では基底細胞および傍基底細胞に局在し、有棘層より上層では認められなかった。一方、癌組織では陽性細胞は腫瘍癌巣辺縁部の癌細胞に多く認められたが、び慢性に浸潤する癌では陽性細胞が散在性に分布す

Table 1. Relationship between the sampling time after development of tumor and the degree of basement membrane loss

Sampling time after development of tumor (week)	Number of hamsters tested	Number of hamsters showing degree of basement membrane loss of			Rate of hamsters with discontinuous type or wide spread loss type to number of hamsters tested (%)
		Continuous type	Discontinuous type	Wide spread loss type	
13	9	5	3	1	44.4
14	6	3	3	0	50.0
15	9	4	2	3	55.6
16	8	2	3	3	75.0
17	9	2	4	3	77.8
Total	41	16	15	10	61.0

※, $P < 0.05$

Table 2. Relationship between the mode of invasion and the degree of basement membrane loss

Grade of mode of invasion	Number of hamsters tested	Number of hamsters showing degree of basement membrane loss of			Rate of hamsters with discontinuous type or wide spread loss type to number of hamsters tested (%)
		Continuous type	Discontinuous type	Wide spread loss type	
1	12	9	3	0	25.0
2	6	4	2	0	33.3
3	18	3	8	7	83.3
4C	5	0	2	3	100
Total	41	16	15	10	61.0

※, $P < 0.01$

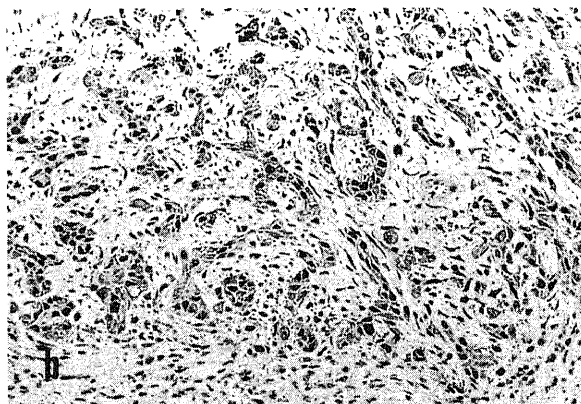
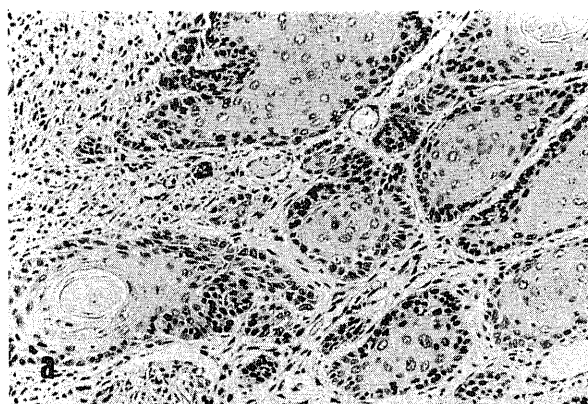


Fig. 9. Immunohistochemical staining for PCNA of invasive cancer showing PCNA-positive cells with dark nuclei. [a], in carcinomas with a well defined border line. PCNA-positive cells are localized in nuclei of peripheral cells of tumor nest (×120). [b], in the diffuse invasive carcinomas positive cells are scattered and show a high-PCNA-labeling index (×150).

る傾向を認めた (図 9)。

2. PCNA 陽性細胞率および、それと浸潤様式との関係

第 1 実験と第 2 実験で発癌の確認できた 69 匹について、PCNA 陽性細胞率を算定したところ、6.7%~46.9% と個々の腫瘍によって大きな差がみられ、平均±標準偏差は $18.4 \pm 7.10\%$ であった。これを浸潤様式別に検討したところ、1 型 $13.5 \pm 4.22\%$ 、2 型 $15.6 \pm 6.51\%$ 、3 型 $18.8 \pm 4.44\%$ 、4C 型 $26.6 \pm 8.00\%$ と 1 型から 4C 型になるにつれて、すなわち浸潤傾向が強くなるにつれ PCNA 陽性率は高くなる傾向を示し (図 10)、統計学的には各々 1, 2, 3 型と 4C 型との間に有意差を認めた ($P < 0.05$)。

考 察

浸潤様式 (mode of invasion) は、1973 年に Jakobsson ら⁹⁾によって初めて報告された頭頸部扁平上皮癌の組織学的悪性度の一指標である。1983 年、Yamamoto ら⁸⁾はこの浸潤様式のうち、び慢性に浸潤する 4 型を索状型 (4C 型) とび慢性 (4D 型) に細分類し、1 型から 4D 型になるにつれて転移形成率が高くなり、予後不良例が多くなることを報告した。その後、この浸潤様式分類は口腔扁平上皮癌における化学療法効果やリンパ節転移形成率、さらに予後と密接に関連する所見であることが多くの施設から報告^{24)~26)}されるようになり、今日では、口腔扁平上皮癌の重要な悪性度因子の 1 つとして注目されている。しかしながら、症例による浸潤像の違いが何故生じるかについては未だ解明されていない。そこで当教室では口腔扁平上皮癌の浸潤様式に関する実験的研究を 1989 年以来系統的に開始し、コラーゲンゲル培地を用いた浸潤モデルの作製⁵⁾¹⁰⁾ やヌードマウスの舌、口底部への癌細胞移植法¹¹⁾¹²⁾ についての成果の一端を既に

発表してきた。本研究では口腔癌の中で最も頻度の高い舌癌の発癌モデルを用いて、発癌から進展癌までの肉眼的および組織学的観察を行い、その過程における口腔扁平上皮癌の浸潤増殖像の様相について検討したところ新たな知見が得られた。

口腔領域に発生する悪性腫瘍はほとんどの場合肉眼で直視可能であるため、肉眼的臨床像からその性格を判断しようとする試みが古くから行われてきた²⁷⁾²⁸⁾。上野²⁹⁾は口腔扁平上皮癌を発育形態から外向性と内向性に大別し、さらに臨床視診型として膨隆型、潰瘍型、肉芽型、白板型、乳頭型の 5 型に分類している。戸塚³⁰⁾はこれらの臨床視診型から 137 例の口腔扁平上皮癌について検討し、内向性の発育を示す膨隆型と潰瘍型の腫瘍は外向性である肉芽型、白板型、乳頭型の腫瘍に比べて細胞異型が強い傾向にあるとし、内向性の腫瘍が高い悪性度を有している可能性を示唆している。また小浜³¹⁾は、外向性の腫瘍はブレオマイシン (bleomycin) をはじめとする抗癌剤に感受性が高く予後が良好であるのに対して、早期から潰瘍を形成する腫瘍は内向性で進行が早いと予後が悪いと述べている。同様に、口腔扁平上皮癌の肉眼的発育形態は悪性度と関連性があるとする意見が多い^{27)~32)}。

ところで、肉眼的発育形態が腫瘍の発育増殖の様相を外側から観察した所見であるとするならば、浸潤様式はまさに癌細胞の深部への浸潤増殖の様相を内側から観察した所見であり、両者の間には何等かの関係が存在することが推測される。畑田³³⁾はニトロキノリンオキシド (4-nitroquinoline, 1-oxide, 4NQO) 誘発ラット舌癌モデルを用いた実験で内向性発育の腫瘍には浸潤様式 4C 型、4D 型の高度浸潤例が多かったと報告しており、本実験でも外向性腫瘍に比較して内向性のものでは浸潤様式が高度になる傾向を認めた。これは発癌後に腫瘍が進展して行く過

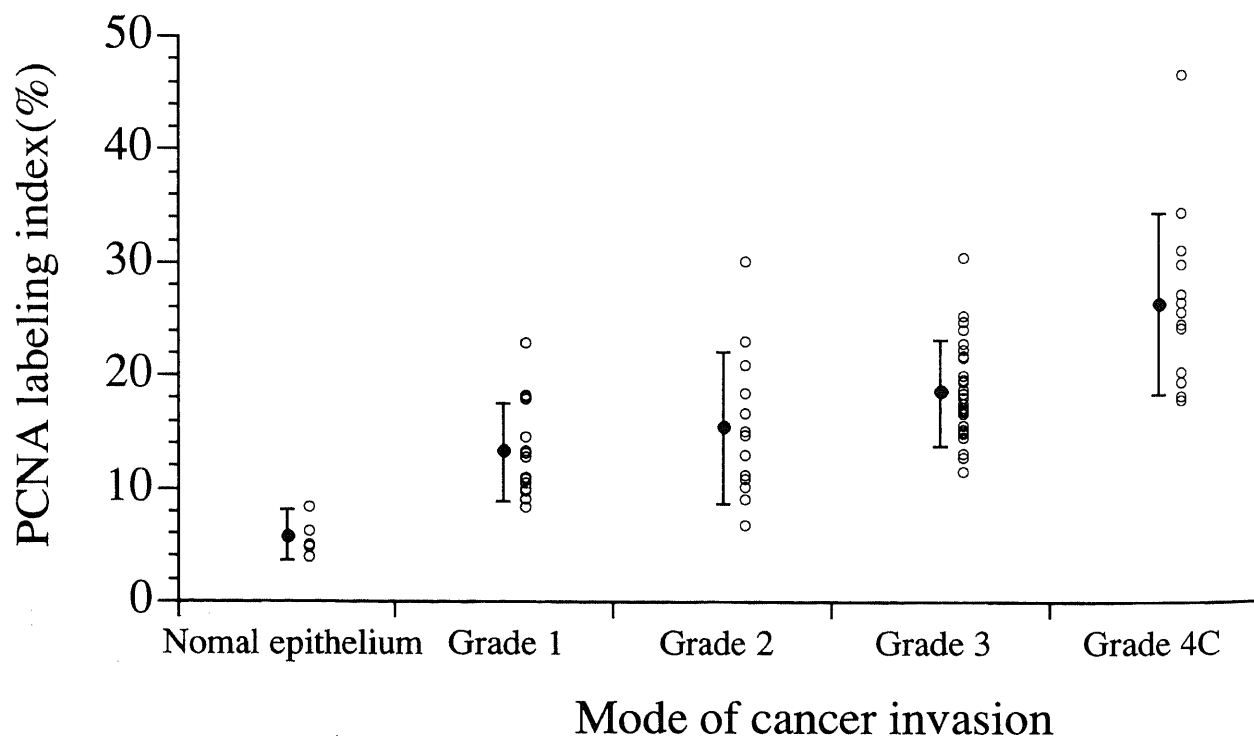


Fig. 10. Relationship between the mode of invasion and PCNA labeling index. As the mode of cancer invasion increased from grade 1 to grade 4C, the PCNA labeling index gradually increased. The PCNA labeling index in grade 4C was significantly higher than those in the other grades ($p < 0.05$). ○, PCNA labeling index of the respective hamsters; ●, mean ± SD.

程で、周囲の間質を破壊しながら浸潤して行く能力のある細胞が多ければ、内部に向かって増殖し、結果として内向性発育の様相を呈し、逆に浸潤力の弱い細胞集団から成る腫瘍であれば、増殖にともない外部に向かって大きくなるためではないかと考えられる。すなわち、肉眼的発育形態は個々の腫瘍の浸潤能力の違いを反映しており、その結果として悪性度と関連していることが示唆された。

歯牙や捕獲物などが存在する口腔は、他臓器に比べて機械的刺激の加わり易い部位といえる。実際の臨床においても、隣接する歯牙に一致して深い潰瘍を形成している腫瘍をしばしば認めることがあるが、このような機械的刺激が口腔扁平上皮癌の浸潤にどのような影響を及ぼしているかについては不明である。そこで本研究では、発癌後の刺激の違いによって浸潤像がどのように変化するかについて検討を行った。その結果、腫瘍形成後にも刺激を継続したA群、DMBAのみ塗布したB群、無刺激としたC群の各群間に大きな差はなく、わずかにB、C群に比してA群では1、2型は少なく、3型が多かった程度に留まっていた。第1実験において発育形態の観察を行った結果では、腫瘍形成時から肉眼的に外向性と内向性に大別され、これらの内向性のものには4C型の高度浸潤像が多くみられたことから、発癌操作を行った12週間の発癌刺激の蓄積により形成された腫瘍細胞の自律的性格がそれ以降の刺激の有無よりも、浸潤像の決定に強く反映したものと考えられる。

発癌時の機械的刺激について、近藤³⁰⁾によれば、機械的刺激によって誘導される組織の再生増殖は、その緊急性のゆえにDNA複製が誤りがちとなり、突然変異細胞が増え、分化異常、永遠の分裂能力を同時に備えた細胞が発生する可能性が高くなると述べている。また、Fujitaら³⁰⁾の実験では、機械的刺激の有無によって、発癌までに要した期間、発癌率、死亡した時期について有意な差を認めている。したがって、発癌に至るまでの機械的刺激は重要な因子であり、癌の浸潤能にも影響を及ぼしていると思われる。また、今回の第2実験の結果では、A群はB群やC群と比較して浸潤様式1、2型は少なく3型が多く認められたことにより、1、2型の多い外向性腫瘍の一部には発癌後さらに加えられた刺激によって浸潤能が増すものもあると推察された。臨床においても、癌に接する歯牙や捕獲物などの機械的刺激因子は早期に除去されることが望ましく、また不要な外科的侵襲は極力避けるべきであるとされている³⁰⁾³⁷⁾。本モデルにおいては、発癌後の機械的刺激と浸潤能との間には若干の関連性を認めるに留まったが、この機械的刺激についてはわれわれ口腔外科を担当する臨床家にとって特に重要な問題である。

進行した口腔扁平上皮癌では早期癌に比べて内向性の発育を呈する症例が多く認められる³⁰⁾が、はたして癌の増大・進展に伴って浸潤像は変化するのであろうか。発癌モデルを使用して実験する利点の一つに、研究者が発癌初期から腫瘍死までの段階でも自由に選んで観察できることが挙げられる。そこで本研究では、発癌後の経過に伴って浸潤像に違いが認められるか否かについて検討を行った。すなわち、第2実験において13週目(発癌初期)から17週目(進行癌)までの各標本採取時期における浸潤様式について検討した。その結果、腫瘍の増大とともに、深部組織への浸潤増殖像がみられ、浸潤様式は次第に高度なものが増える傾向にあった。また、第1実験の結果から腫瘍死直前には浸潤様式3型、4C型の腫瘍が比較的多いことが判

明した。これらの結果は腫瘍の増大進展に伴い、癌の浸潤能が高まる可能性³⁸⁾を示唆している。早期癌と進行癌のp53遺伝子欠失頻度を調査した報告³⁹⁾⁴⁰⁾では、17p染色体(p53遺伝子領域)欠失頻度が進行癌で高く、しかも、他の染色体にも異常が発見される頻度が高くなると述べられている。したがって、癌が進展していく過程で遺伝子に付加的異常が加わることにより、次第に高度浸潤癌としての性格を獲得していくのではないかと考えられた。しかし、内向性の腫瘍においては腫瘍死直前の状態で4C型が非常に多く認められるので、初期癌後(15週目)、すなわち間質に浸潤しはじめる最初の段階からすでに慢性浸潤のものもあったのではないと思われる。今回の実験では詳細な検討は行われなかったが、初めから4C型のごとく慢性に浸潤するタイプと、進行に伴って細胞の性格が変化し次第に浸潤性の癌に変化するタイプの両方があるように思われる。先に述べたように、発癌後に刺激を止めた群の中にも慢性の浸潤像を呈するものがみられることから、発癌時すでに慢性の浸潤能を有する腫瘍が存在することは充分考えられる。なお今回の実験では、最も浸潤傾向の強い4D型は残念ながら認められなかった。畑田³³⁾の4NQOの経口投与による実験では、4D型が認められていることから、この違いが発癌刺激付与の方法による差であったと考ええると、極めて興味深いことである。

扁平上皮癌や腺癌のような上皮性の悪性腫瘍は、癌細胞が基底膜で囲まれており、これらの癌が浸潤や転移をきたすには、まず間質との境界である基底膜が取り除かれなければならないと考えられている⁴¹⁾。最近、基底膜特異成分であるN型コラーゲンやラミニンのモノクローナル抗体を用いた免疫染色によって、癌細胞周囲の基底膜の変化が浸潤や転移との関係で詳細に検討されるようになった^{42)~46)}。基底膜の存在の有無は浸潤能とは直接関係しないとする報告⁴²⁾もあるが、乳癌⁴³⁾、大腸癌⁴⁴⁾、頭頸部癌⁴⁵⁾では、基底膜消失例は浸潤性が強く転移形成率が高いことが認められている。Kumagaiら⁴⁶⁾は口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における基底膜の変化は浸潤様式やリンパ節転移の有無と密接に関連していたと述べている。今回の実験結果では、全体の61.0%に基底膜の不連続や広範囲消失の変化がみられた。これら基底膜の変化と浸潤様式、標本採取時期、発癌刺激との関連を検討した結果、最も関連のみられたのは浸潤様式であり、浸潤様式が1型から4C型になるにつれて、基底膜の不連続群や広範囲消失群が増加する傾向にあった。また、頸部リンパ節に転移を認めたものはいずれも広範囲消失群であった。これらの結果は、口腔扁平上皮癌における基底膜の消失の程度が癌の浸潤能や転移能と密接に関連していることを示唆している。悪性腫瘍における基底膜消失の機序としては、腫瘍細胞の基底膜構成成分の産生能力の低下⁴⁷⁾や、N型コラーゲナーゼをはじめとする基底膜分解酵素による破壊⁴⁷⁾⁴⁸⁾、あるいは癌細胞周囲に浸潤する炎症性細胞の関与⁴⁹⁾などが指摘されているが、まだ不明の点も多い。今後、口腔扁平上皮癌における基底膜消失の機序が明らかにされれば、癌の浸潤や転移の防止に大きく役立つものと期待される。

PCNAはDNA合成酵素であるDNAポリメラーゼ δ の活性発現に不可欠な蛋白であり、細胞周期のG₀期にはほとんど認められないが、G₁後期に核小体を中心に出現し、S期には核全体に認められ、S後期以後は消失するとされる⁵⁰⁾。抗PCNA抗体を用いた免疫染色はホルマリン固定パラフィン包埋標本で

も可能なことから、最近、さまざまな組織の増殖能を客観的に評価する目的で広く用いられるようになった。癌組織における PCNA 標識率は、増殖活性の指標として臨床病理学的諸因子との関係から検討され、胃癌⁵¹⁾、肺癌⁵²⁾、前立腺癌⁵³⁾、乳癌⁵⁴⁾などで、分化度や病期、予後との関連性が指摘されている。口腔癌⁵⁵⁾では分化度や細胞異型度との相関性が認められているが、浸潤様式との関連性で検討された報告は見当たらない。そこで本研究では浸潤先進部における増殖活性と浸潤様式の関係について、抗 PCNA 抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。その結果、浸潤様式が 1 型から 4C 型になるにつれ PCNA の平均陽性率は高くなり、び慢性の浸潤像を示す 4C 型では陽性細胞は散在性に分布し、陽性率は最も高値を示した。同様の所見は大腸癌における研究⁵⁶⁾でも認められており、浸潤能と増殖能との関連性が示唆されている。

増殖と浸潤は転移と並んで悪性腫瘍の生物学的特性であり、高い増殖能を有する癌が浸潤性の強い傾向にあることは興味深い。しかしながら一方で、増殖活性の高い癌細胞が必ずしも高い浸潤能を保有しているわけではないとする意見⁵⁷⁾もある。今回の実験結果でも、PCNA 陽性率が 20% 以上の高値でありながら浸潤様式が 1 型や 2 型のものも認められた。このことは、癌の増殖能が必ずしも浸潤性に影響を及ぼす因子ではないことを示唆している。Nakajima ら⁵⁸⁾は癌の浸潤や転移には癌細胞側の因子ばかりではなく、周囲間質の線維芽細胞が産出するサイトカインや増殖因子が重要な役割を果たしているとして述べている。また、著者ら¹¹⁾はヌードマウスを用いた実験で、同じ癌細胞株でも移植する部位により浸潤像は異なり、口腔扁平上皮癌細胞を口腔内に移植した場合、皮下移植ではみられなかった深部組織への浸潤像が観察され、しかも原発腫瘍の組織像と最も類似することを報告している。これらから、浸潤には間質側の因子も深く関与していることが示唆される。今後は浸潤に及ぼす間質側の因子についての検討も必要であると考えられた。

結 論

実験的誘発ハムスター舌癌モデルを用い、口腔扁平上皮癌の浸潤増殖動態の解明を目的として、腫瘍の肉眼的発育形態と浸潤様式との関係、発癌初期からの浸潤像の変化、発癌後の刺激の違いによる浸潤像の変化、癌胞巣周囲の基底膜の変化と浸潤様式との関係、浸潤先進部における増殖活性と浸潤様式との関係について検討したところ、以下の結論を得た。

1. 第 1 実験に用いた 28 匹のハムスター全例に扁平上皮癌が認められた。これらの発癌から腫瘍死までの腫瘍の変化を肉眼的に観察したところ、腫瘍が外向性発育を示したものは 21 匹 (75.0%)、内向性のものは 7 匹 (25.0%) に認められた。

2. 腫瘍死直前の腫瘍を浸潤様式別に分類したところ、浸潤傾向の低い 1 型から 4C 型まで各々 4 匹 (14.3%)、7 匹 (25.0%)、9 匹 (32.1%)、8 匹 (28.6%) であったが、最も高浸潤性の 4D 型は、認められなかった。

3. 肉眼的発育形態と浸潤様式との関連性を検索した結果、外向性の腫瘍には浸潤様式 1、2 型の低浸潤傾向のものが多かったのに対し、内向性のものでは浸潤様式が高度な 3 型、4C 型になる傾向を認め、両者の間には有意差が認められた。

4. 第 2 実験で発癌が認められた 41 匹のうち、13 週以後も歯科用クレンザーによる擦過と発癌剤の塗布を続けた A 群では、

発癌剤の塗布のみを続けた B 群や放置した C 群と比較して、浸潤様式 1、2 型が少なく 3 型が多い傾向がみられた。

5. 各実験群とも実験開始後 13 週、14 週の発癌初期には浸潤様式は 1 型、2 型が多いが、次第に 3 型が増加し、び慢性の浸潤像を示す 4C 型は 15 週目以後の癌にみられた。すなわち、癌の進行増大とともに浸潤性も高まる傾向にあった。

6. 第 2 実験における浸潤先進部の癌胞巣周囲の基底膜の状態を連続群、不連続群、広範囲消失群に分類すると、その頻度は各々 16 匹 (39.0%)、15 匹 (36.6%)、10 匹 (24.4%) であった。これと腫瘍の進行や浸潤様式との関連性では、腫瘍が進行するにつれ、また浸潤様式が 1 型から 4C 型になるにつれ、不連続群や広範囲消失例が多く認められ、特に 4C 型では基底膜の連続例は全例認められなかった。

7. 全実験群の浸潤先進部における PCNA 陽性率は 6.7~46.9%、平均 18.4% であり、この陽性率と浸潤様式との関連では浸潤様式が 1 型から 4C 型になるにつれて高くなる傾向にあり、4C 型においては 26.6% と特に高値を示した。

以上の結果から、本実験における舌扁平上皮癌の浸潤能は内向性の腫瘍で高く、また、腫瘍の増大進展に伴いより高度になることが示され、さらに浸潤傾向の強い癌では腫瘍胞巣周囲の基底膜は消失し、高い増殖活性を有することが明らかになった。

謝 辞

稿を終える臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部歯科口腔外科学講座の山本悦秀教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を頂きました本学医学部歯科口腔外科学講座の熊谷茂宏講師に厚く御礼申し上げます。更に、本研究の遂行にあたり御協力を頂きました当講座の滝野隆久先生、方 治先生ならびに医局員と大学院生の各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨の一部は、第 37 回日本口腔外科学会総会 (1992 年 11 月、横浜) において発表した。

文 献

- 1) Macfarlane, G. J., Boyle, P. & Scully, C.: Oral cancer in Scotland: changing incidence and mortality. *Eur. Inst. Oncol.* 305, 1121-1123 (1992).
- 2) 山本悦秀, 中川清昌, 藤元栄輔, 室木俊美, 熊谷茂宏, 児島伸也, 高塚茂之: 口腔粘膜癌に対する組織学的悪性度評価法の意義. 癌の臨床, 35, 1665-1672 (1989).
- 3) Jakobsson, P. A., Eneroth, C., Killander, D., Moberger, G. & Martensson, B.: Histological classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol.* 12, 1-8 (1973).
- 4) Lund, C., Sogaard, H., Elbrond, O., Jorgensen, K. & Andresen, P.: Epidermoid carcinoma of the tongue; Histologic grading in the clinical evaluation. *Acta Radiol. Thera. Physiol. Biol.* 14, 513-521 (1975).
- 5) Willen, A., Nathanson, A., Moberger, G. & Anneroth, A.: Squamous cell carcinoma of gingiva; Histological classification and grading of malignancy. *Acta otolaryngol.* 79, 146-154 (1975).
- 6) Yamamoto, E., Sunakawa, H. & Kohama, G.: Clinical course of diffuse invasive carcinoma of the tongue excised after Bleomycin treatment. *J. Oral Maxillofac. Surg.*

- 11, 269-274 (1983).
- 7) Yamamoto, E., Miyakawa, A. & Kohama, G.: Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*, 6, 938-947 (1984).
- 8) Yamamoto, E., Kohama, G., Sunakawa, H., Iwai, M. & Hiratsuka, H.: Mode of invasion, Bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, 51, 2175-2180 (1983).
- 9) 児島伸也: 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能に関する実験的研究. 十全医会誌, 101, 266-281 (1992).
- 10) 児島伸也, 熊谷茂宏, 川尻秀一, 山本悦秀, 河原 栄, 横井敏一: 口腔扁平上皮癌の浸潤と転移の機序に関する実験的研究. 第1報: in vitro モデルにおける浸潤動態の検討. 口科誌, 42, 471-479 (1993).
- 11) 川尻秀一, 熊谷茂宏, 児島伸也, 山本悦秀: 口腔扁平上皮癌の浸潤と転移の機序に関する実験的研究. 第2報: 新しい in vivo 浸潤モデルの開発. 口科誌, 42, 480-486 (1993).
- 12) 川尻秀一, 熊谷茂宏, 方 治, 児島伸也, 山本悦秀: 口腔扁平上皮癌の浸潤と転移の機序に関する実験的研究. 第3報: ノードマウス口腔内移植法の口腔癌転移モデルとしての応用. 口科誌, 42, 534-540 (1993).
- 13) Bonne, C.: Über geschwulste bei teertieren. *Ztschr. Krebsforsch.*, 25, 1-22 (1927).
- 14) Levy, B. M.: The effect of a chemical carcinogen (20-methyl cholanthrene) on oral tissues. A preliminary report. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 1, 582 (1948).
- 15) Kolas, S.: Investigation of normal human saliva for possible anticarcinogenic action and chemical carcinogenesis in mucous membranes. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 8, 1192-1203 (1955).
- 16) Salley, J. J.: Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. *J. Dent. Res.*, 33, 253-262 (1954).
- 17) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢, 小野江為則: 舌癌の実験的形成に関する研究. 第1編: 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene の塗布による舌癌の実験的形成. 口科誌, 21, 999-1011 (1972).
- 18) Ohtake, K., Shingaki, S. & Nakajima, T.: Effects of incision and irradiation on regional lymph node metastasis in carcinoma of the hamster tongue. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 70, 62-69 (1990).
- 19) 末廣達成: ハムスター口腔癌形成過程における免疫組織化学的研究—口腔癌形成過程におけるケラチンの局在とレクチンの結合性について—. 日口外誌, 38, 405-423 (1992).
- 20) 安田元昭: 実験的舌癌の免疫組織学的研究. 口科誌, 41, 213-233 (1992).
- 21) 大関 悟: 口腔粘膜扁平上皮癌に対する Bleomycin の効果. 第2編, ハムスターの 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene 誘発舌癌に対する効果. 口科誌, 30, 238-253 (1981).
- 22) 赤沢 登, 大西 克, 大矢隆志, 繁田幸慶, 石田寿夫, 中西孝一, 島田桂吉: DMBA 誘発ハムスター舌腫瘍の形成と治療に関する研究. 第IV編, ハムスター舌腫瘍に及ぼす FT207 と細胞表面酵素阻害物質 (ベスタチン) 併用の影響について. 口科誌, 32, 535-543 (1983).
- 23) Hidaka, S., Morita, N., Ohnishi, T., Ogawa, Y. & Abe, K.: Inhibitory effect of prostaglandin oligomeric derivatives on 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene induced hamster lingual carcinomas. *Cancer Lett.*, 61, 171-176 (1992).
- 24) Kinjo, T., Yamashiro, M., Sunakawa, H., Arasaki, A., Tuhako, W., Kishaba, M., Ganaha, M. & Hentona, C.: Clinicopathological study on the effects of induction chemotherapy in squamous cell carcinoma of the gingiva. *Oral Maxillofac. Surg. Proceedings 16 th congress IAMFS*, 160-162 (1991).
- 25) Kinoshita, Y., Honma, Y., Nakamura, M., Soh, T. & Shimura, K.: Multivariate analysis of cervical lymph node metastasis in carcinoma of the tongue. *Oral Maxillofac. Surg. Proceedings 16 th congress IAMFS*, 170-173 (1991).
- 26) Hiratsuka, H., Kohama, G., Yamamoto, E., Sunakawa, H., Iwai, M., Miyakawa, A., Kumagai, S., Odani, M., Yamaguchi, A. & Tsutsumida, R.: Statistical Analysis of Factors Associated with Tumor Response to Preoperative Chemotherapy in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Clinical Application of OK-432 for Control of Cancer*, 1st ed., p289-296, Excerpta Medica, Tokyo, 1986.
- 27) Paymaster, J. C.: Cancer of the buccal mucosa, A clinical study of 650 cases in indian patients. *Cancer*, 9, 431-435 (1956).
- 28) Gardner, A. F., Hamburger, S. & Love, S.: Oral carcinoma: analysis of one hundred and eighty-nine cases. *J. Am. Dent. Assoc.*, 66, 456-465 (1963).
- 29) 上野 正: 口腔癌の治療に関する研究. 口病誌, 36, 4-19 (1969).
- 30) 戸塚盛雄: 口腔領域悪性腫瘍新鮮症例の臨床, 組織および細胞学的研究—特にその臨床視診型, TNM 分類と組織学的所見について—. 口病誌, 38, 94-130 (1971).
- 31) 小浜源都: 口腔癌の化学療法効果に関する臨床, 病理, 細胞免疫学的研究—特に臨床病理学的悪制度とブレオマイシン効果および予後について—. 口科誌, 33, 672-698 (1984).
- 32) Sandler, H., C.: A retrospective study of a head and neck cancer control program. *Cancer*, 25, 1153-1161 (1970).
- 33) 畑田憲一: 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発ラット舌癌に対する peplomycin の抗腫瘍効果に関する実験的研究. 日口外誌, 38, 1745-1765 (1992).
- 34) 近藤宗平: 発がんの仕組みを考える—突然変異の視点から—. 科学, 53, 148-155 (1983).
- 35) Fujita, K., Kaku, T., Sasaki, M. & Onoe, T.: Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene. *J. Dent. Res.*, 52, 327-332 (1973).
- 36) 上野 正: 口腔癌に関係のある歯牙の処置. 歯界展望, 24, 161-170 (1964).
- 37) Goldman, L. B.: Cancer and the dentist. *J. Am. Dent. Assoc.*, 42, 371-376 (1951).
- 38) 山本悦秀, 砂川 元, 小浜源都: び慢性浸潤型口腔扁平上皮癌に関する研究. 日口外誌, 28, 1471-1479 (1982).
- 39) Miyaki, M., Seki, M., Okamoto, M., Yamanaka, A.,

- Maeda, Y., Tanaka, K., Kikuchi, R., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Nakamura, Y., White, R., Miki, Y., Utsunomiya, J. & Koike, M.: Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.*, **50**, 7166-7173 (1990).
- 40) 宮本美知子, 矢ノ下玲, 小西元子, 田中貴代子, 小池盛雄: 多段階発癌における p53 遺伝子異常の意義. *実験医学*, **10**, 964-968 (1992)
- 41) Timpl, R.: Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 487-502 (1989).
- 42) Gusterson, B. A., Warburton, M. J., Mitchell, D., Kraft, N. & Hancock, W. W.: Invading squamous cell carcinoma can retain a basal lamina. *Lab. Invest.*, **51**, 82-87 (1984).
- 43) Sakr, W. A., Zarbo, R. J. & Crissman, J. D.: Immunohistologic distribution of basement membrane in breast neoplasia. *Surg. Pathol.*, **1**, 3-12 (1988).
- 44) Foster, S. J., Talbot, I. C., Clayton, D. G. & Critchley, D. R.: Tumor basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum; An immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int. J. Cancer*, **37**, 813-817 (1986).
- 45) Carter, R. L., Burman, J. F. & Barr, L.: Immunohistochemical localization of basement membrane type IV collagen in invasive and metastatic squamous carcinomas of the head and neck. *J. Pathol.*, **147**, 159-164 (1985).
- 46) Kumagai, S., Kojima, S., Kato, R., Fujimoto, E., Nakagawa, K., Yamamoto, E., Kawahara, E. & Nakanishi, I.: Distribution of collagens type (I, III, IV, V and VI) in the stroma of oral carcinomas. *Oral Maxillofac. Surg. Proceedings 16th congress IAMFS*, 232-233 (1991).
- 47) Liotta, L. A., Rao, C. N. & Sanford, H. B.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, **49**, 636-649 (1983).
- 48) Liotta, L. A.: Tumor invasion and the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.*, **46**, 1-7 (1986).
- 49) Heck, L. W., Blackburn, W. D., Irwin, M. H., & Abrahamson, D. R.: Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G. *Am. J. Pathol.*, **136**, 1267-1273 (1990).
- 50) Takasaki, Y., Deng, J. S. & Tan, E. M.: A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. *J. Exp. Med.*, **154**, 1899-1909 (1981).
- 51) Yonemura, Y., Kimura, H., Fushida, S., Tugawa, K., Nakai, Y., Kaji, M., Fonseca, L., Yamaguchi, A. & Miyazaki, I.: Analysis of proliferative activity using anti-proliferating cell nuclear antigen antibody in gastric cancer tissue specimens obtained by endoscopic biopsy. *Cancer*, **71**, 2448-2453 (1993).
- 52) Fontanini, G., Macchiarini, P., Pepe, S., Ruggiero, A., Hardin, M., Bigini, D., Vignati, S., Pingitore, R. & Angeletti, C. A.: The expression of proliferating cell nuclear antigen in paraffin sections of peripheral, node-negative non-small cell lung cancer. *Cancer*, **70**, 1520-1527 (1992).
- 53) Visakorpi, T.: Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. *J. Pathol.*, **168**, 7-13 (1992).
- 54) Narita, T., Funahashi, H., Satoh, Y. & Takagi, H.: Proliferating cell nuclear antigen immunostaining in breast cancer and its relation to prognosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 20-25 (1993).
- 55) Tsuji, T., Sasaki, K., Kimura, Y., Yamada, K., Mori, M. & Shinozaki, F.: Measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its clinical application in oral cancers. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **21**, 369-372 (1992).
- 56) Mayer, A., Takimoto, M., Fritz, E., Schellander, G., Kofler, K. & Ludwig, H.: The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer*, **71**, 2454-2460 (1993).
- 57) Kawahara, E., Okada, Y., Nakanishi, I., Iwata, K., Kojima, S., Kumagai, S. & Yamamoto, E.: The expression of invasive behavior of differentiated squamous carcinoma cell line evaluated by an in vitro invasion model. *Jpn. Cancer Res.*, **84**, 409-418 (1993).
- 58) Nakajima, M., Morikawa, K., Fabra, A., Corazon, D. B. & Fidler, I. J.: Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1890-1898 (1990).

Investigation in to the Invasive and Proliferative Activity of Experimental Induced Tongue Carcinoma

Shyuich Kawasiri, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., 102, 645—657 (1993)

Key words tongue carcinoma induced by DMBA, mode of invasion, progression of cancer, basement membrane, proliferating cell nuclear antigen

Abstract

In order to elucidate the factors contributory to the expression of invasiveness of oral squamous cell carcinoma, the mode of invasion of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (DMBA) induced tongue carcinoma of the hamster was examined. A 1.0% solution of DMBA in acetone was applied to the right lateral border of the hamster's tongue three times per week after that part of the tongue was scratched with a endodontic barbed broach. In the first experiment, the procedures were continued until the hamsters became cachexia, when they were killed and submitted for histological examination. After the 12th week of the experiment, the majority of hamsters had a carcinomatoid tumor at the treatment site of the tongue. Macroscopically, the tumors were classified into two types: exophytic and endophytic growth types. A statistical analysis revealed that the macroscopical growth types correlated to the mode of invasion ($p < 0.05$). Tumors were more invasive in the endophytic type than in the exophytic type. In the second experiment, the above carcinogenic procedures were continued until the end of the 12th week, when the hamsters were randomly divided into three groups: group A received the same procedures until killed, group B receive only the application of DMBA and group C remained untreated after 12th week. The hamsters were killed from the 13th week to the 17th week and submitted for histological examination. Tumors were more invasive in group A than in groups B and C. But the difference between the three groups was not statistically significant. There was a significant correlation ($p < 0.05$) between the sampling time after carcinogenesis and the mode of invasion. Early cancer generally showed well or moderately defined tumor-host boundaries, while tumors with no distinct borderline or diffuse invasion increased as the cancer progressed. Carcinomas with a widespread loss of basement membrane showed more diffuse invasion. There was a significant correlation ($p < 0.01$) between the degree of basement membrane loss and the mode of cancer invasion. As the mode of invasion increased from grade 1 to grade 4C, the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index of carcinoma cells gradually increased. The PCNA labeling index in grade 4C was significantly higher than that in the other grade groups ($p < 0.05$).